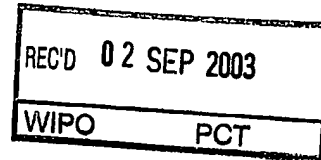


# BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

**PRIORITY DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)



## Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

**Aktenzeichen:** 103 05 531.2

**Anmeldetag:** 11. Februar 2003

**Anmelder/Inhaber:** Morphochem AG Aktiengesellschaft für  
kombinatorische Chemie, München/DE

**Bezeichnung:** Tubulysinkonjugate

**IPC:** C 07 K, A 61 K

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 19. Juni 2003  
**Deutsches Patent- und Markenamt**  
Der Präsident  
Im Auftrag

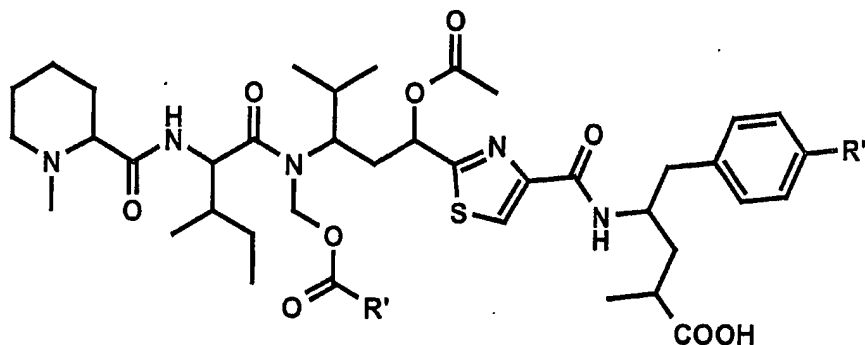
Wegner



### Tubulysinkonjugate

Die vorliegende Erfindung betrifft neue Tubulysin-  
konjugate sowie deren Verwendung zur Behandlung von  
5 Krebserkrankungen.

Die Tubulysine wurden erstmals von der Gruppe von Höfle  
und Reichenbach (GBF Braunschweig) aus einer Kulturbrühe  
von Stämmen des Myxobakteriums *Archangium gephyra*  
10 isoliert (F. Sasse et al. J. Antibiot. 2000, 53, 879-885;  
WO9813375; DE 10008089). Diese Verbindungen haben eine  
ausgesprochen hohe cytotoxische Aktivität gegenüber  
Säugetierzelllinien mit  $IC_{50}$ -Werten im picomolaren Bereich  
und sind daher als potentielle Krebsmedikamente von  
15 grossem Interesse.



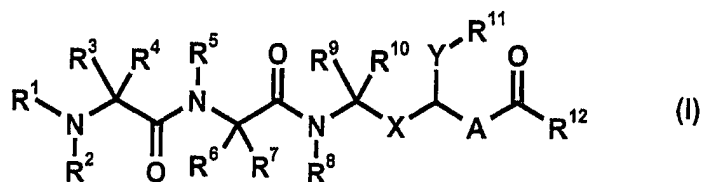
- 20 Tubulysin A:  $R' = CH_2CH(CH_3)_2$ ;  $R'' = OH$   
Tubulysin B:  $R' = CH_2CH_2CH_3$ ;  $R'' = OH$   
Tubulysin C:  $R' = CH_2CH_3$ ;  $R'' = OH$   
Tubulysin D:  $R' = CH_2CH(CH_3)_2$ ;  $R'' = H$   
Tubulysin E:  $R' = CH_2CH_2CH_3$ ;  $R'' = H$   
25 Tubulysin F:  $R' = CH_2CH_3$ ;  $R'' = H$

Die extrem hohe Cytotoxizität der Tubulysine bringt aber auch einige Nachteile mit sich: eine hohe allgemeine Toxizität sowie eine geringe Selektivität gegenüber normalen Zellen. Eine Möglichkeit, diese Nachteile zu umgehen besteht in der Verwendung von Polymerkonjugaten als Transportmittel, die im Körper bevorzugt Krebszellen ansteuern und gesundes Gewebe schonen.

Ziel der vorliegenden Erfindung war es, neuartige Tubulysinkonjugate, insbesondere Konjugate mit synthetischen Polymeren bereitzustellen, die bessere pharmakologische Eigenschaften, vor allem eine höhere Selektivität bei bestehender Cytotoxizität sowie eine geringere Toxizität, als die Naturstoffe aufweisen.

Die vorliegende Erfindung betrifft Konjugate der allgemeinen Formel U-V-W, wobei

U die Formel (I) aufweist,



wobei

A ein gegebenenfalls substituierter 5- oder 6-gliedriger Heteroaromat ist;

X ein Sauerstoffatom, ein Schwefelatom, eine Gruppe der Formel  $\text{NR}^{13}$  oder  $\text{CR}^{14}\text{R}^{15}$  ist;

Y ein Sauerstoffatom, ein Schwefelatom oder eine Gruppe der Formel  $\text{NR}^{16}$  ist und

- 5 die Reste  $\text{R}^1, \text{R}^2, \text{R}^3, \text{R}^4, \text{R}^5, \text{R}^6, \text{R}^7, \text{R}^8, \text{R}^9, \text{R}^{10}, \text{R}^{11}, \text{R}^{12}, \text{R}^{13}, \text{R}^{14}, \text{R}^{15}$  und  $\text{R}^{16}$  unabhängig voneinander ein Wasserstoffatom, ein Alkyl-, Alkenyl-, Alkinyl-, Heteroalkyl-, Aryl-, Heteroaryl-, Cycloalkyl-, Alkylcycloalkyl-, Heteroalkylcycloalkyl-, Heterocyclo-
- 10 alkyl-, Aralkyl- oder ein Heteroaralkylrest, oder zwei der Reste gemeinsam Teil eines Cycloalkyl- oder Heterocycloalkylringsystems sind,

V ein Linker und W ein Polymer ist.

15

- Der Ausdruck Alkyl bezieht sich auf eine gesättigte, geradkettige oder verzweigte Kohlenwasserstoffgruppe, die 1 bis 50 Kohlenstoffatome, vorzugsweise 1 bis 12 Kohlenstoffatome, besonders bevorzugt 1 bis 6
- 20 Kohlenstoffatome aufweist, z.B. die Methyl-, Ethyl-, Isopropyl-, Isobutyl-, tert-Butyl-, n-Hexyl-, 2,2-Dimethylbutyl-, n-Octyl-, Allyl-, Isoprenyl- oder Hex-2-enyl-Gruppe.

- 25 Die Ausdrücke Alkenyl und Alkinyl beziehen sich auf zumindest teilweise ungesättigte, geradkettige oder verzweigte Kohlenwasserstoffgruppen, die 2 bis 50 Kohlenstoffatome, vorzugsweise 2 bis 12 Kohlenstoffatome, besonders bevorzugt 2 bis 6 Kohlenstoffatome aufweisen,
- 30 z. B. die Allyl-, Acetylenyl-, Propargyl-, Isoprenyl- oder Hex-2-enyl-Gruppe.

Der Ausdruck Heteroalkyl bezieht sich auf eine Alkyl-, eine Alkenyl- oder eine Alkynyl-Gruppe, in der ein oder mehrere (bevorzugt 1, 2, 3, 4 oder 5) Kohlenstoffatome durch ein Sauerstoff-, Stickstoff-, Phosphor- oder Schwefelatom ersetzt sind (bevorzugt Sauerstoff oder Stickstoff), z.B. eine Alkyloxy-Gruppe wie z.B. Methoxy oder Ethoxy, oder eine Methoxymethyl-, Nitril-, Methylcarboxyalkylester-, Carboxyalkylester- oder 2,3-Dioxyethyl-Gruppe. Der Ausdruck Heteroalkyl bezieht sich des weiteren auf eine Carbonsäure oder eine von einer Carbonsäure abgeleitete Gruppe wie z. B. Acyl, Acyloxy, Carboxyalkyl, Carboxyalkylester z.B. Methyl-carboxyalkylester, Carboxyalkylamid, Alkoxycarbonyl oder Alkoxycarbonyloxy.

15

Der Ausdruck Cycloalkyl bzw. Cyclo- bezieht sich auf eine gesättigte oder teilweise ungesättigte cyclische Gruppe, die einen oder mehrere Ringe aufweist, die ein Gerüst bilden, welches 3 bis 14 Kohlenstoffatome, vorzugsweise 3 bis 10 Kohlenstoffatome enthält, z.B. die Cyclopropyl-, Cyclohexyl-, Tetralin- oder Cyclohex-2-enyl-Gruppe.

Der Ausdruck Heterocycloalkyl bzw. Heterocyclo bezieht sich auf eine Cycloalkylgruppe wie oben definiert, in der ein oder mehrere (bevorzugt 1, 2 oder 3) Kohlenstoffatome durch ein Sauerstoff-, Stickstoff-, Phosphor- oder Schwefelatom ersetzt sind und kann beispielsweise für die Piperidin-, Morpholin-, N-Methylpiperazin- oder N-Phenylpiperazin-Gruppe stehen.

30

Die Ausdrücke Alkylcycloalkyl bzw. Heteroalkylcycloalkyl beziehen sich auf Gruppen, die entsprechend den obigen Definitionen sowohl Cycloalkyl- bzw. Heterocycloalkyl-

wie auch Alkyl-, Alkenyl-, Alkynyl- und/oder Heteroalkylgruppen enthalten.

Der Ausdruck Aryl bzw. Ar bezieht sich auf eine  
 5 aromatische Gruppe, die einen oder mehrere Ringe hat, und  
 durch ein Gerüst gebildet wird, das 5 bis 14 Kohlen-  
 stoffatome, vorzugsweise 5 oder 6 bis 10 Kohlenstoffatome  
 enthält z.B. eine Phenyl-, Naphthyl-, 2-, 3- oder  
 4-Methoxyphenyl-, 2-, 3- oder 4-Ethoxyphenyl-,  
 10 4-Carboxyphenylalkyl- oder 4-Hydroxyphenyl-Gruppe.

Der Ausdruck Heteroaryl bzw. Heteroaromat bezieht sich  
 auf eine Aryl-Gruppe, in der ein oder mehrere (bevorzugt  
 1, 2 oder 3) Kohlenstoffatome durch ein Sauerstoff-,  
 15 Stickstoff-, Phosphor- oder Schwefelatom ersetzt sind,  
 z.B. die 4-Pyridyl-, 2-Imidazolyl-, 3-Pyrazolyl- und Iso-  
 chinolinyl-Gruppe.

Die Ausdrücke Aralkyl bzw. Heteroaralkyl beziehen sich  
 20 auf Gruppen, die entsprechend den obigen Definitionen  
 sowohl Aryl- bzw. Heteroaryl- wie auch Alkyl-, Alkenyl-,  
 Alkynyl- und/oder Heteroalkyl- und/oder Cycloalkyl-  
 und/oder Heterocycloalkylgruppen enthalten, z.B. die  
 Tetrahydroisochinolinyl-, Benzyl-, 2- oder 3-Ethyl-  
 25 indolyl- oder 4-Methylpyridino-Gruppe.

Die Ausdrücke Alkyl, Alkenyl, Alkynyl, Heteroalkyl,  
 Cycloalkyl, Heterocycloalkyl, Aryl, Heteroaryl, Aralkyl  
 und Heteroaralkyl beziehen sich auch auf Gruppen, in  
 30 denen ein oder mehrere Wasserstoffatome solcher Gruppen  
 durch Fluor-, Chlor-, Brom- oder Jodatome oder OH, SH, NH<sub>2</sub>  
 oder NO<sub>2</sub>-Gruppen ersetzt sind. Diese Ausdrücke beziehen  
 sich weiterhin auf Gruppen, die mit unsubstituierten

Alkyl-, Alkenyl-, Alkynyl-, Heteroalkyl-, Cycloalkyl-, Heterocycloalkyl-, Aryl-, Heteroaryl-, Aralkyl- oder Heteroaralkyl-Gruppen substituiert sind.

- 5 Der Ausdruck Linker bezieht sich auf eine Gruppe, die dazu verwendet wird, Verbindungen der Formel (I) mit einem Polymer zu verbinden. Ein Linker kann eine direkte Bindung, eine Alkylen-, Alkenylen-, Alkinylen-, Heteroalkylen-, Arylen-, Heteroarylen-, Cycloalkylen-, Alkylcycloalkylen-, Heteroalkylcycloalkylen-, Heterocycloalkylen-, Aralkylen- oder eine Heteroaralkylengruppe sein. Bevorzugt ist der Linker im Blut-Plasma stabil (insbesondere hydrolysestabil), metabolisch spaltbar und nach der Spaltung nicht toxisch.
- 10
- 15 Als Polymere kommen synthetische Polymere wie z. B. Polyethylenglycol (MW = 200, 300, 400, -30.000), Polyethylenglycol Dendrimere, Polyacrylsäure, Polylactid-co-glycolid, poly-D,L-lacticacid-p-dioxanone-polyethylene glycol block copolymer (PLA-DX-PEG), Poly(ortho)ester, Polyglutamate, Polyaspartate, Polymer aus  $\alpha$ - $\beta$ -ungesättigten monomeren: (meth)acrylic acid, crotonic acid, maleic acid, maleic anhydride, fumaric acid, itaconic acid/anhydride, etc. comonomere umfassend:
- 20
- 25 Vinylether, Vinylester, Vinylamide, Olefine, Diallyldialkyl-ammonium-halogene, bevorzugt Vinylether, Poly(diethylenglycoladipat), Polyethylenimin, Polyglycolid, Polyharnstoff, Polylimonen (=Polylimo), Poly(2-methyl-1,3-propylenadipat), Propfpolymere, Graft (Block-)
- 30 Polymere mit anderen Polymeren.

Weitere Beispiele für Linker und Polymere sind in G. T. Hermanson, Biokonjugate Techniques, Academic Press, San Diego, 1996 beschrieben.

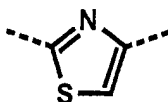
- 5 Verbindungen der Formel (I) können aufgrund ihrer Substitution ein oder mehrere Chiralitätszentren enthalten. Die vorliegende Erfindung umfasst daher sowohl alle reinen Enantiomere und alle reinen Diastereomere, als auch deren Gemische in jedem Mischungsverhältnis.

10

Bevorzugt ist X eine CH<sub>2</sub>-Gruppe.

Wiederum bevorzugt ist Y ein Sauerstoffatom.

- 15 Weiter bevorzugt weist A die folgende Struktur auf:



- 20 Des weiteren bevorzugt sind R<sup>1</sup> und R<sup>3</sup> zusammen Teil eines Cycloalkylrings; besonders bevorzugt weisen R<sup>1</sup> und R<sup>3</sup> zusammen die Formel -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>- auf.

Weiter bevorzugt ist R<sup>2</sup> eine C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> Alkylgruppe, besonders bevorzugt eine Methylgruppe.

- 25 Des weiteren bevorzugt sind R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup> und R<sup>10</sup> Wasserstoffatome.

Wiederum bevorzugt ist R<sup>7</sup> eine Alkylgruppe; besonders bevorzugt eine Gruppe der Formel -CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>.



Des weiteren bevorzugt ist  $R^8$  ein Wasserstoffatom, eine Alkyl-, Alkenyl- oder eine Heteroalkylgruppe; besonders bevorzugt eine Gruppe der Formel  $-CH_2OC(=O)R^{17}$ , wobei  $R^{17}$  eine  $C_1$ - $C_6$  Alkyl- oder eine  $C_1$ - $C_6$  Alkenylgruppe ist.

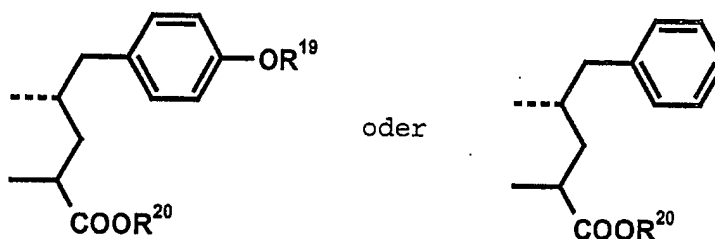
5

Wiederum bevorzugt ist  $R^9$  eine Alkylgruppe; besonders bevorzugt eine Gruppe der Formel  $-CH(CH_3)_2$ .

10 Weiter bevorzugt ist  $R^{11}$  ein Wasserstoffatom oder eine Acetylgruppe.

Weiter bevorzugt ist  $R^{12}$  eine Gruppe der Formel  $NHR^{18}$ , wobei  $R^{18}$  eine Heteroaralkylgruppe ist.

15 Des weiteren bevorzugt weist  $R^{18}$  die folgenden Strukturen auf:



wobei  $R^{19}$  und  $R^{20}$  unabhängig voneinander Wasserstoffatome, Alkyl-, Alkenyl-, Alkinyl-, Heteroalkyl-, Aryl-, Heteroaryl-, Cycloalkyl-, Alkylcycloalkyl-, Heteroalkylcycloalkyl-, Heterocycloalkyl-, Aralkyl- oder Heteroaralkylgruppen sind; besonders bevorzugt sind  $R^{19}$  und  $R^{20}$  Wasserstoffatome. Gegebenenfalls kann der Phenylring substituiert sein (z. B. durch eine  $NO_2$ -Gruppe).

Besonders bevorzugt ist die Verbindung der Formel (I) Tubulysin A.

Weiter bevorzugt ist der Linker über die Reste  $R^8$ ,  $R^{11}$ ,  $R^{19}$  oder  $R^{20}$  an Verbindungen der Formel (I) gebunden; besonders bevorzugt über  $R^{19}$  oder  $R^{20}$ .

5

Des weiteren bevorzugt ist das Polymer ein Polyethylen-glycol, das insbesondere über  $R^{20}$  an Tubulysin A gebunden ist.

- 10 Pharmakologisch akzeptable Salze, Solvate, Hydrate oder Formulierungen der hier beschriebenen Konjugate sind ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung. Beispiele für pharmakologisch akzeptable Salze der Verbindungen der Formel (I) sind Salze von physiologisch
- 15 akzeptablen Mineralsäuren wie Salzsäure, Schwefelsäure und Phosphorsäure oder Salze von organischen Säuren wie Methansulfonsäure, p-Toluolsulfonsäure, Milchsäure, Essigsäure, Ameisensäure, Trifluoressigsäure, Zitronensäure, Bernsteinsäure, Fumarsäure, Maleinsäure
- 20 und Salicylsäure. Verbindungen der Formel (I) können solvatisiert, insbesondere hydratisiert sein. Die Hydratisierung kann z.B. während des Herstellungsverfahrens oder als Folge der hygroskopischen Natur der anfänglich wasserfreien Verbindungen der Formel (I) auftreten.

25

Die pharmazeutischen Zusammensetzungen gemäß der vorliegenden Erfindung enthalten mindestens eine Verbindung der Formel (I) als Wirkstoff und fakultativ Trägerstoffe und/oder Adjuvantien.

30

Die therapeutische Verwendung der Verbindungen der Formel (I), ihrer pharmakologisch akzeptablen Salze bzw. Solvate und Hydrate sowie Formulierungen und pharmazeutischen

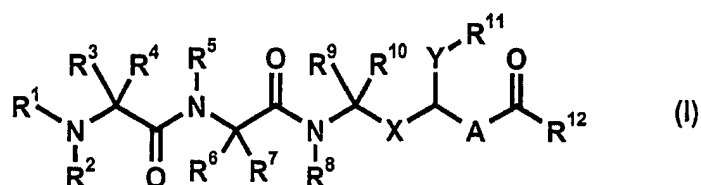
13  
Zusammensetzungen liegt ebenfalls im Rahmen der vor-  
liegenden Erfindung.

- Auch die Verwendung dieser Wirkstoffe zur Herstellung von
- 5 Arzneimitteln zur Behandlung von Krebserkrankungen ist Gegenstand der vorliegenden Erfindung. Des weiteren sind die vorliegenden Verbindungen bei der Vorbeugung und/oder Behandlung von rheumatoider Arthritis, entzündlichen Erkrankungen, Immunologisch bedingten Krankheiten (z. B.
- 10 Diabetes Typ 1), Autoimmunkrankheiten sowie weiteren Tumorerkrankungen von großem Interesse. Im allgemeinen werden Verbindungen der Formel (I) unter Anwendung der bekannten und akzeptablen Modi, entweder einzeln oder in Kombination mit einem beliebigen anderen therapeutischen
- 15 Mittel verabreicht. Solche therapeutisch nützlichen Mittel werden bevorzugt parenteral, z.B. als injizierbare Lösung verabreicht. Zur Herstellung von flüssigen Lösungen kann man Arzneimittelträgerstoffe wie z.B. Wasser, Alkohole oder wäßrige Salzlösungen verwenden. Die
- 20 pharmazeutisch verwendbaren Mittel können auch Zusatzstoffe zur Konservierung, Stabilisierung, Salze zur Veränderung des osmotischen Drucks, Puffer und Antioxidantien enthalten.
- 25 Kombinationen mit anderen therapeutischen Mitteln können weitere Wirkstoffe beinhalten, die gewöhnlich zur Behandlung von Krebserkrankungen eingesetzt werden.

# Patentansprüche

1. Verbindungen der allgemeinen Formel U-V-W, wobei

5 U die Formel (I) aufweist,



wobei

10

A ein gegebenenfalls substituierter 5- oder 6-gliedriger Heteroaromat ist;

15

X ein Sauerstoffatom, ein Schwefelatom, eine Gruppe der Formel  $\text{NR}^{13}$  oder  $\text{CR}^{14}\text{R}^{15}$  ist;

Y ein Sauerstoffatom, ein Schwefelatom oder eine Gruppe der Formel  $\text{NR}^{16}$  ist und

20

die Reste  $\text{R}^1$ ,  $\text{R}^2$ ,  $\text{R}^3$ ,  $\text{R}^4$ ,  $\text{R}^5$ ,  $\text{R}^6$ ,  $\text{R}^7$ ,  $\text{R}^8$ ,  $\text{R}^9$ ,  $\text{R}^{10}$ ,  $\text{R}^{11}$ ,  $\text{R}^{12}$ ,  $\text{R}^{13}$ ,  $\text{R}^{14}$ ,  $\text{R}^{15}$  und  $\text{R}^{16}$  unabhängig voneinander ein Wasserstoffatom, ein Alkyl-, Alkenyl-, Alkinyl-, Heteroalkyl-, Aryl-, Heteroaryl-, Cycloalkyl-, Alkylcycloalkyl-, Heteroalkylcycloalkyl-, Hetero-

25

cycloalkyl-, Aralkyl- oder ein Heteroaralkylrest, oder zwei der Reste gemeinsam Teil eines Cycloalkyl- oder Heterocycloalkylringsystems sind,

V ein Linker und W ein Polymer ist.

2. Verbindungen nach Anspruch 1, wobei die Verbindung der Formel (I) Tubulysin A ist.

5

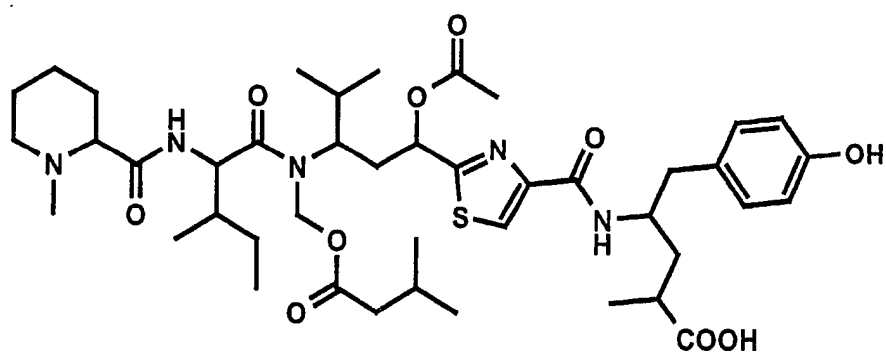
3. Verbindungen nach Anspruch 1 oder 2, wobei das Polymer ein Polyethylenglycol (PEG) ist.

10

4. Verwendung eines Biokonjugats nach einem der Ansprüche 1 bis 3 zur Behandlung von Krebserkrankungen.

### Zusammenfassung

Die Vorliegende Erfindung betrifft neue Tubulysin-  
konjugate (z. B. von Tubulysin A) sowie deren Verwendung  
5 zur Behandlung von Krebserkrankungen.



Tubulysin A